

© EPODOC / EPO

PN - JP1038657 A 19890208  
PD - 1989-02-08  
PR - JP19870193691 19870804  
OPD - 1987-08-04  
TI - SOLID PHASE ANTIBODY FOR IMMUNOASSAY  
IN - KUSUMI MIYOKO; AOYANAGI SHIGEO; INNAMI YOSHIYUKI;  
MATSUYUKI AKIRA  
PA - MEIDENSHA ELECTRIC MFG CO LTD  
IC - G01N33/551

© WPI / DERWENT

TI - Solid phase antibody for immunoassay - obtd. by adsorbing antibody on surface of solid phase of tricalcium phosphate  
PR - JP19870193691 19870804; JP19870040887 19870804  
PN - JP1038657 A 19890208 DW198912 008pp  
PA - (MEID ) MEIDENSHA ELEC MFG CO LTD  
IC - G01N33/55  
AB - J01038657 Solid antibody is obtd. by adsorbing an antibody on the surface of a solid phase, using tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ball as solid phase. USE/ADVANTAGE - The solid phase antibody is useful for determining the concn. of antigenic substance (e.g. AFP, CEA, etc.). As the amt. of antibody adsorbed on a solid phase can be increased the detecting sensitivity in immunoassay at esp. low concn. side of antigen can be increased and reproducibility improved.(0/0)  
OPD - 1987-08-04  
AN - 1989-088902 [12]

© PAJ / JPO

PN - JP1038657 A 19890208  
PD - 1989-02-08  
AP - JP19870193691 19870804  
IN - KUSUMI MIYOKO; others:03  
PA - MEIDENSHA ELECTRIC MFG CO LTD  
TI - SOLID PHASE ANTIBODY FOR IMMUNOASSAY  
AB - PURPOSE: To enhance the detection sensitivity in immunoassay, by using a tricalcium phosphate  $\{\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\}$  ball as a solid phase for holding an antibody.  
- CONSTITUTION: In a solid phase antibody for immunoassay for

adsorbing an antibody on the surface of a solid phase, a tricalcium phosphate  $\{Ca_3(PO_4)_2\}$  ball is used as the solid phase. By this method, the adsorbing amount of the antibody is increased and the detection sensitivity in immunoassay can be enhanced.

I - G01N33/551

⑬ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-38657

⑤ Int.Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)2月8日

G 01 N 33/551

7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 免疫分析用固相抗体

⑮ 特 願 昭62-193691

⑯ 出 願 昭62(1987)8月4日

⑰ 発 明 者	久 住	美 代 子	東京都品川区大崎2丁目1番17号	株式会社明電舎内
⑰ 発 明 者	青 柳	重 夫	東京都品川区大崎2丁目1番17号	株式会社明電舎内
⑰ 発 明 者	印 南	義 之	東京都品川区大崎2丁目1番17号	株式会社明電舎内
⑰ 発 明 者	松 行	昭	東京都品川区大崎2丁目1番17号	株式会社明電舎内
⑰ 出 願 人	株 式 会 社 明 電 舎		東京都品川区大崎2丁目1番17号	
⑰ 代 理 人	弁 理 士 佐 藤 正 年			

明 細 書

1. 発明の名称

免疫分析用固相抗体

2. 特許請求の範囲

固相の表面に抗体を吸着させてなる免疫分析用固相抗体において、該固相としてトリカルシウムホスフェイト( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )ボールを使用したことを特徴とする免疫分析用固相抗体。

3. 発明の詳細な説明

A. 産業上の利用分野

この発明は抗原物質の濃度を測定するために使用する免疫分析用固相抗体、特に抗原の低濃度側の検出限界の拡大及び再現性の向上に関するものである。

B. 発明の概要

この発明は、抗体を保持させる固相としてトリカルシウムホスフェイト( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )ボール(以下、「T.C.P.B.」という。)を使用することによ

り、免疫分析における抗原の検出限界を低濃度側で拡大させ、更に再現性を向上させたものである。

C. 従来技術

生化学の分野においては、近年、抗原抗体反応を利用して微量の抗原物質を精度良く分析測定する免疫分析法、特に固相抗体を用いる免疫分析法が注目されている。この固相抗体を用いる免疫分析法は固相に抗体を吸着不溶化させて、これを用いて抗原の濃度を測定する方法であり、これには競合法と非競合法とがある。

競合法は一定量の標識抗原と測定すべき抗原とを一定量の抗体に対して競争的に結合させ、抗体と結合した標識抗原の量から測定すべき抗原の量を知る方法である。

非競合法の中には種々の測定系があるが、サンドイッチ測定法がその代表的な方法である。このサンドイッチ測定法は固相表面に抗体を吸着させ、この抗体に抗原をトラップさせ、トラップさ

れた抗原に更に酵素標識抗体を結合させ、結合したこの酵素標識抗体の量から測定すべき抗原の量を知る方法である。

これらの方法において、固相はポリスチレン、ガラス、アクリルニトリル-ブタジエン-スチレン共重合樹脂(ABS)などが多く用いられている。そして、非親合法においては、固相への抗体吸着量を増加させると検出感度が向上すると考えられている。

#### D. 発明が解決しようとする問題点

上記のような従来の固相抗体では、固相の材質によって抗体の吸着量に差はほとんどなく、固相浸漬液の組成、pH等を検討しても、抗体の吸着量をこれ以上増大させることができず、従って検出感度をこれ以上高めることができないという問題点があった。

#### E. 問題点を解決するための手段

この発明に係る免疫分析用固相抗体は、固相の

表面に抗体を吸着させてなる免疫分析用固相抗体において、該固相としてトリカルシウムホスフェイトボールを使用することにより上記問題点を解決したものである。

#### F. 実施例

##### a. T.C.P.B.とP.B.との抗体吸着量の比較

##### 実施例1

固相としてはT.C.P.B.を、固相抗体としては抗AFP-IgGを、抗原としてはAFPを、標識抗原としては $^{125}\text{I}$ -AFPを各々使用し、T.C.P.B.への $^{125}\text{I}$ -AFPの吸着量を測定する実験をした。ここで、AFPは $\alpha$ -フェトプロテインの略で、主に肝臓の診断に用いられている抗原物質である。

##### [抗AFP-IgGを被覆した固相抗体の調製]

抗AFP-IgGを被覆した固相抗体は第1図に示すようにして調製した。すなわち、6.5mmφのT.C.P.B.を4℃の(0.1mg/ml抗AFP-IgG・0.1mol/l(pH7.5)リン酸緩衝液)〔B液〕に1晩浸

3

漬し、T.C.P.B.をB液で3回洗浄し、(0.01mol/l(pH7.0)リン酸緩衝液、0.1mol/lNaCl、0.1%BSA、0.1%NaN<sub>3</sub>混合液)〔C液〕で3回洗浄し、4℃のC液に浸漬して保存した。

##### [ $^{125}\text{I}$ -AFPの吸着量の測定]

$^{125}\text{I}$ -AFPの吸着量は第2図に示すようにして測定した。すなわち、抗AFP-IgGを被覆したT.C.P.B.を(約 $2 \times 10^{-4}$ cpmの $^{125}\text{I}$ -AFP(100 $\mu$ l)、濃度0~1000ng/mlのAFP(100 $\mu$ l)、C液(100 $\mu$ l))からなる液中に1晩浸漬し、洗浄後、 $\gamma$ -ウエルカウンタで放射線量を計数した。AFP濃度(ng/ml)と放射線量(cpm)との関係は第3図に示すようになった。

##### 比較例1

固相としてはポリスチレンボール(P.B.)を、固相抗体としては抗AFP-IgGを、標識抗原としては $^{125}\text{I}$ -AFPを各々使用し、P.B.への $^{125}\text{I}$ -AFPの吸着量を測定する実験をした。この実験にお

4

いて、抗AFP-IgGを被覆した固相抗体の調製、 $^{125}\text{I}$ -AFPの吸着量の測定は実施例1と同様にして行なった。AFP濃度(ng/ml)と放射線量(cpm)との関係は第3図に示すようになった。

##### 抗体吸着量の評価

固相への抗体吸着量は第3図に示すように実施例1の方が比較例1より多いので、T.C.P.B.の固相の方がP.B.の固相より抗体吸着量が多いといえる。T.C.P.B.固相がP.B.固相と比較して抗体が吸着する程度が大であるのは、T.C.P.B.の生体親和性が強いと考えられる。

##### b. T.C.P.B.とP.B.の非特異的吸着の比較

##### 実施例2-A

固相抗体としては抗AFP-IgGを被覆したT.C.P.B.を、標識抗体としては抗AFP-IgG-GOD標識抗体を各々使用し、標識抗体の非特異的吸着率を求める実験を下記のようにして行なった。ここで、T.C.P.B.の材料としては純粋なB-T.C.P.を

使用した。この $\beta$ -T.C.P.は特願昭60-215153、特願昭60-154253、特願昭60-215152、特願昭61-99344に示す方法で製造したものを使用した（以下の実験においても同様）。また、抗AFP-IgGを被覆したT.C.P.B.は実施例1におけると同様にして調製した。抗AFP-IgG-GOD 標識抗体は下記のようにして調製した。

#### [抗AFP-IgG-GOD 標識抗体の調製]

##### (1) マレイミド GOD 調製法

マレイミド GOD は第4図に示すようにして調製した。すなわち、（約3mg/0.3ml GOD・0.1mol/l (pH 7.0)リン酸緩衝液）を4本用意し、これにサクシニミジル-4-マレイミドブチレート（GMB S）をGOD : GMB S = 1 : 50の比になるように添加し、0.1mol/l (pH 6.0)リン酸緩衝液で平衡化したカラム（セファデックス（登録商標）G25カラム（1×30cm））を用い、12ml/時間で脱塩し、1mlずつ分取し、マレイミド GOD を得た。

7

IgG を等モル混和し、30℃で1時間静置後、4℃で1晩静置し、（0.1mol/l (pH 6.5)リン酸緩衝液・5mmol/l EDTAで平衡化したカラム（セファクリル（登録商標）100カラム（1×90cm））を用い、6ml/時間で上記試料を溶出し、1mlずつ分取し、抗AFP-IgG-GOD 標識抗体を集め、0.1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、0.1% ウシ血清アルブミン（BSA）となるようにNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>及びBSAを添加し、4℃で保存した。

#### [標識抗体の非特異的吸着率を求める実験]

標識抗体の非特異的吸着率は第7図に示すようにして求めた。すなわち、抗AFP-IgG 被覆のT.C.P.B.を100倍希釈の抗AFP-IgG-GOD 標識抗体（0.1ml）に入れ、C液（0.2ml）を添加し、室温で1晩静置し、このT.C.P.B.を蒸留水で3回洗浄し、新しい試験管に移しかえ、（0.5mol/l グルコース・0.01mol/l (pH 5.1)酢酸緩衝液）（0.3ml）を添加し、37℃で2時間静置し、0.1mlをサンプリングし、 $2 \times 10^{-7}$ mol/l ルミノール、

##### (2) SH-抗AFP-IgG 調製法

SH-抗AFP-IgG は第5図に示すようにして調製した。すなわち、抗AFP-IgG を含有する（0.1mol/l リン酸緩衝液（pH 6.0）・5mmol/l EDTA）【A液】（2ml）にS-アセチルメルカプトこはく酸のDMF溶液をS-アセチルメルカプトこはく酸と抗AFP-IgG との比が300:1になるように添加し、室温で30分間攪拌し、（0.1mol/l (pH 7.0)トリス塩酸（0.1ml）、0.1mol/l (pH 7.0)EDTA（0.02ml）、1mol/l (pH 7.0)ヒドロキシアミン水溶液（0.1ml））を加え、30℃で4分間反応させ、A液で平衡化したカラム（セファデックス（登録商標）G25カラム（1×30cm））を用い、12ml/時間で脱塩し、1mlずつ分取し、これを氷冷したコロジオンバッグ中に集め、濃縮してSH-抗AFP-IgG を得た。

##### (3) 抗AFP-IgG-GOD（標識抗体）調製法

抗AFP-IgG-GOD は第6図に示すようにして調製した。すなわち、マレイミド GOD とSH-抗AFP-

8

0.2mol/l (pH 9.8)炭酸緩衝液（0.5ml）、 $6 \times 10^{-3}$ mol/l フェリシアン化カリ水溶液（0.5ml）を添加し、15秒待ち、15～45秒間の発光量を積算して化学発光強度A（count/30sec）を求めた。また、上記の実験で使用した抗AFP-IgG-GOD 標識抗体液についてその化学発光強度B（count/30sec）を上記と同様にして求めた。そして、（A/B）×100を非特異的吸着率（%）とした。この実験における非特異的吸着率は第1表に示すようになった。

#### 実施例3-A

固相抗体としては抗CEA-IgGを被覆したT.C.P.B.を、標識抗体としては抗CEA-IgG-GOD 標識抗体を各々使用し、実施例2-Aと同様の実験をした。この実験における非特異的吸着率は第1表に示すようになった。ここでCEAは癌胎児性抗原の略で、主に大腸癌の診断に用いられている物質である。

## 比較例 2 - A

固相抗体としては抗 AFP-IgG を被覆した P.B. を、標識抗体としては抗 AFP-IgG-GOD 標識抗体を各々使用し、実施例 2 - A と同様の実験をした。この実験における非特異的吸着率は第 1 表に示すようになった。

## 比較例 3 - A

固相抗体としては抗 CEA-IgG を被覆した P.B. を、標識抗体としては抗 CEA-IgG-GOD 標識抗体を各々使用し、実施例 2 - A と同様の実験をした。この実験における非特異的吸着率は第 1 表に示すようになった。

## 酵素標識抗体の非特異的吸着率の比較

固相への酵素標識抗体の非特異的吸着率は第 1 表に示すように、実施例 2 - A、3 - A と比較例 2 - A、3 - A で差が少ないので、サンドイッチ測定法の感度を左右する主な要因の 1 つである酵素標識抗体の固相への非特異的吸着は、生体親和

性の強い T.C.P.B. 固相と P.B. 固相との間では差がないと考えられる。これは、抗体を固相へ吸着後、牛血清アルブミンによるブロックが、T.C.P.B. 固相の場合でも P.B. 固相の場合と同程度に有効であるためと考えられる。

第 1 表

例	非特異的吸着率(%)
実施例 2 - A	0.014
〃 3 - A	0.013
比較例 2 - A	0.016
〃 3 - A	0.013

## c. 測定範囲、検出限界の比較

## 実施例 2 - B

固相抗体としては抗 AFP-IgG を被覆した T.C.P.B. を、標識抗体としては抗 AFP-IgG-GOD 標識抗体を各々使用し、AFP 濃度 (ng/ml) と化学発光強度 (cpm) との関係 (検量線) を求める実験を下記のようにして行なった。

1 1

## [ 検量線を求める実験 ]

第 8 図に示すように、抗 AFP-IgG を被覆した T.C.P.B. 1 個を C 液で希釈した AFP 標準液 (0.1 ml) に加え、C 液 (0.2 ml) を添加し、室温で 6 時間静置し、蒸留水で T.C.P.B. を 3 回洗浄し、C 液で最適希釈倍率に希釈した抗 AFP-IgG-GOD 標識抗体 (0.1 ml) を加え、C 液 (0.2 ml) を添加し、室温で 1 晩静置し、蒸留水で 3 回洗浄し、T.C.P.B. を新しい試験管に移しかえ、(0.5 mol/l グルコース、0.01 mol/l (pH 5.1) 酢酸緩衝液 (0.3 ml)) を加え、37℃ で 2 時間静置し、0.1 ml をサンプリングし、(  $2 \times 10^{-7}$  mol/l ルミノール、0.2 mol/l (pH 9.8) 炭酸緩衝液 (0.5 ml)、 $8 \times 10^{-3}$  mol/l フェリシアン化カリ水溶液 (0.5 ml) を添加し、15 秒待ち、16~45 秒間の発光量を積算して化学発光強度 (count/30sec) を求めた。AFP 濃度 (ng/ml) と化学発光強度 (count/30sec) との関係は第 9 図に示すようになった。

## 実施例 3 - B

1 2

固相抗体としては抗 CEA-IgG を被覆した T.C.P.B. を、標識抗体としては抗 CEA-IgG-GOD 標識抗体を各々使用し、実施例 2 - B と同様にして化学発光強度 (count/30sec) を求めた。CEA 濃度 (ng/ml) と化学発光強度 (count/30sec) との関係は第 10 図に示すようになった。

## 比較例 2 - B

固相抗体としては抗 AFP-IgG を被覆した P.B. を、標識抗体としては抗 AFP-IgG-GOD 標識抗体を各々使用し、実施例 2 - B と同様にして化学発光強度 (count/30sec) を求めた。AFP 濃度 (ng/ml) と化学発光強度 (count/30sec) との関係は第 9 図に示すようになった。

## 比較例 3 - B

固相抗体としては抗 CEA-IgG を被覆した P.B. を、標識抗体としては抗 CEA-IgG-GOD 標識抗体を各々使用し、実施例 2 - B と同様にして化学発光強度 (count/30sec) を求めた。CEA 濃度 (ng/ml)

と化学発光強度 (count/30sec) との関係は第10図に示すようになった。

#### 測定範囲、検出限界の評価

測定範囲、検出限界は第9図及び第10図に示すように、実施例2、3の方が比較例2、3よりも低濃度域で広がっているので、T.C.P.B.固相を用いた方がP.B.固相の場合よりも測定範囲、検出限界を広げさせることができる。これは、T.C.P.B.の抗体吸着量が大であることと、固相への抗体結合の際、抗体の免疫活性が失われ難いため2つの理由が挙げられる。T.C.P.B.固相とP.B.固相の測定上限が同値なのは、添加した酵素標識抗体量が制限因子になっているためと考えられる。

#### d. 検出限界における再現性の評価

実施例2-B、3-Bと比較例2-B、3-Bについて検出限界における日内変動と日間変動を比較した。T.C.P.B.固相を用いたAFP、CEAの検出限界における再現性は、第2表に示すようにP.B.

固相の再現性よりも優れていた。検出限界でのT.C.P.B.固相の再現性がP.B.固相よりも優れているのは、固相ごとの抗体吸着量の差がP.B.固相より小さいためと考えられる。

第2表

例	再現性	変動率(%)
実施例2-B 0.5ng/ml AFP	日内変動	7.8
	日間変動	6.3
実施例3-B 0.25ng/ml CEA	日内 "	5.3
	日間 "	8.4
比較例2-B 2.5ng/ml AFP	日内 "	10.9
	日間 "	15.3
比較例3-B 1ng/ml AFP	日内 "	13.2
	日間 "	12.6

\* 日内変動 n = 8  
日間変動 n = 6

#### 実施例4

前記特許出願におけると同様にして製造した下

15

記のア～エの4つの組成のT.C.P.B.を用いて前記実施例2、3と同様な実験を行ない、金属イオンの溶出を調べた。

ア. 純粋なβ-TCP

イ. Mg/(Ca+Mg)比でMgを0.2含んだβ-TCP

ウ. Sr/(Ca+Sr)比でSrを0.05含んだβ-TCP

エ. Ba/(Ca+Ba)比でBaを0.05含んだβ-TCP

実験の結果、各試料共、Mg<sup>++</sup>、Sr<sup>++</sup>、Ba<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>の溶出は殆どみられなかった。従って、これらの組成のT.C.P.B.を使用して抗体を結合させてもその抗体の免疫性が失なわれることはないと考えられる。

上記ア～エの組成のT.C.P.B.を使用して実施例2-B、3-Bと同様な実験をしたところ、実施例2-B、3-Bと同様な結果が得られた。この結果と実施例2-B、3-Bの結果とを考え合わせると、主成分がβ-TCPであれば検出限界、測定範囲ともP.B.よりも優れていることがわかる。

ところで上記説明では、標識酵素としてGODを

16

使用する場合について述べたが、その他、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、β-D-ガラクトシダーゼなどを標識酵素として用いても同様の結果が得られた。

#### G. 発明の効果

この発明は以上説明したとおり、T.C.P.B.固相を使用して抗体の吸着量を増大させたので、免疫分析における検出感度を高めることができるという効果がある。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は抗AFP-IgGを被覆した固相抗体の調製手順を示す工程図、第2図は<sup>125</sup>I-AFPの吸着量の測定手順を示す工程図、第3図はAFP濃度(ng/ml)とγ線量(cpm)との関係を示すグラフ、第4図はマレイミドGODの調製手順を示す工程図、第5図はSH-抗AFP-IgGの調製手順を示す工程図、第6図は抗AFP-IgG-GOD標識抗体の調製手順を示すグラフ、第7図は標識抗体の非特異的吸着量を

求める操作手順を示す工程図、第8図は検量線を求める実験の操作手順を示す工程図、第9図はAFP濃度と化学発光強度との関係を示すグラフ、第10図はCEA濃度と化学発光強度との関係を示すグラフである。

代理人 弁理士 佐藤正年

# 第 1 図

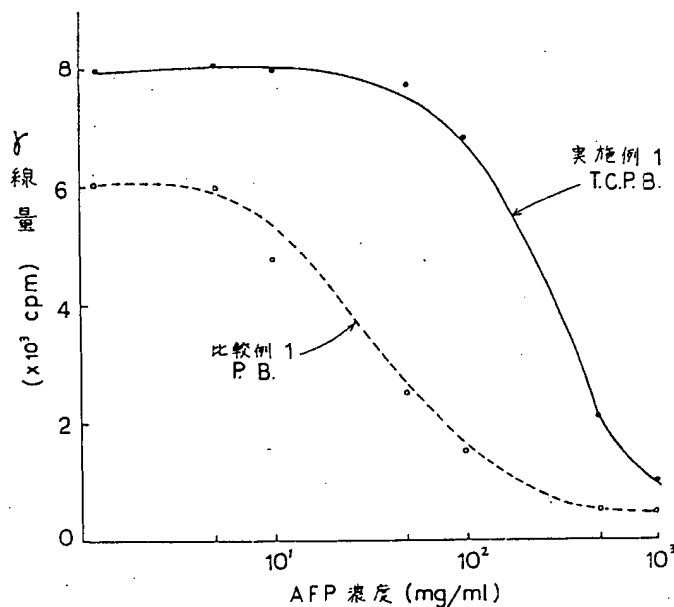
6.5 mmφの固相(T.C.P.B.,P.B.)  
↓  
4℃の{ 0.1mg/ml 抗AFP-IgG · 0.1 mol/l (pH 7.5)リン酸緩衝液}  
【B液】に1晩浸漬  
↓  
固相(T.C.P.B.,P.B.)をB液で3回洗浄  
↓  
{0.01mol/l (pH 7.0)リン酸緩衝液、0.1 mol/l NaCl、  
0.1% BSA、0.1% NaN<sub>3</sub> 混合液}【C液】で3回洗浄  
↓  
4℃のC液に浸漬して保存

# 第 2 図

抗体(抗AFP-IgG)を被覆した固相(T.C.P.B.,P.B.)  
↓  
○約  $2 \times 10^{-4}$  cpm の<sup>125</sup>I-AFP (100 μl)  
○0~1000ng/ml のAFP (100 μl)  
○C液 (100 μl)  
↓  
1晩浸漬  
↓  
洗 浄  
↓  
γ-ウェルカウンターで放射線量を計数

1 9

# 第 3 図





第 4 図

(約 3 mg/0.3 ml GOD · 0.1 mol/l (pH 7.0) リン酸緩衝液) × 4  
 ⇒ G M B S を GOD : G M B S = 1 : 5 0  
 の比になるように添加  
 ↓  
 0.1 mol/l (pH 6.0) リン酸緩衝液で平衡化したカラム  
 (セファデックス (登録商標) G 2 5 カラム (1 × 30 cm) )  
 を用い、12 ml/時間で脱塩  
 ↓  
 1 ml ずつ分取 (マレイミド GOD)

第 5 図

抗AFP-IgG を含有する {0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 6.0) ·  
 5 mmol/l EDTA} [A液] (2 ml)  
 ↓  
 ⇒ S-アセチルメルカプトコハク酸の DMF 溶液を  
 S-アセチルメルカプトコハク酸と抗AFP-IgG と  
 の比が 100:1 になるように添加  
 ↓  
 室温で 30 分間攪拌  
 ↓  
 ⇒ 0.1 mol/l (pH 7.0) トリス塩酸 (0.1 ml)、  
 0.1 mol/l (pH 7.0) EDTA (0.02 ml)、  
 1 mol/l (pH 7.0) ヒドロキシアミン水溶液 (0.1 ml)  
 を添加  
 ↓  
 30℃で 4 分間反応  
 ↓  
 A 液で平衡化したカラム { (セファデックス (登録商標)  
 G 2 5 カラム (1 × 30 cm) ) を用い、12 ml/時間で脱塩  
 ↓  
 1 ml ずつ分取  
 ↓  
 氷冷したコロジオンバッグ中に集めて濃縮  
 ↓  
 SH-抗AFP-IgG

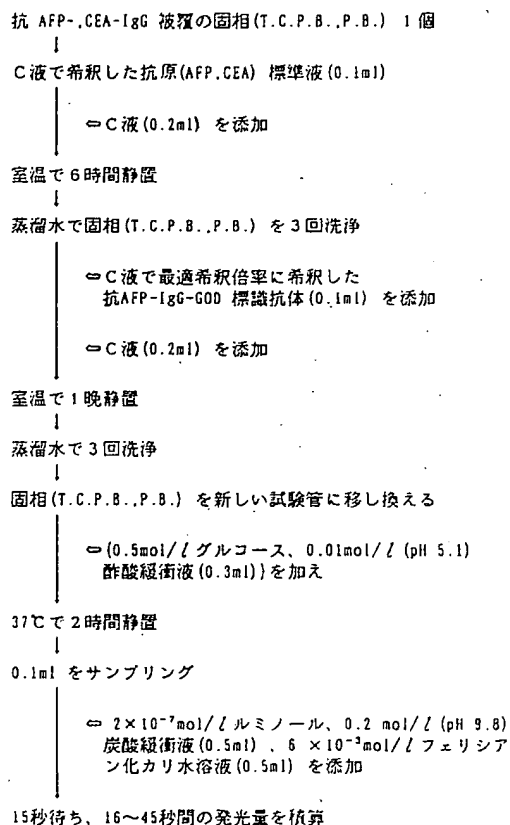
第 6 図

マレイミド GOD と SH-抗AFP-IgG を等モル混和  
 ↓  
 30℃で 1 時間静置  
 ↓  
 4℃で 1 晩静置  
 ↓  
 (0.1 mol/l (pH 6.5) リン酸緩衝液 · 5 mmol/l EDTA で  
 平衡化したカラム (セファクリル (登録商標) 300 カラム  
 (1 × 90 cm) を用い、6 ml/時間で上記試料を溶出  
 ↓  
 1 ml ずつ分取  
 ↓  
 抗AFP-IgG-GOD 標識抗体を集め  
 ↓  
 ⇒ 0.1 % NaN<sub>3</sub>、0.1 % BSA となるように  
 NaN<sub>3</sub> 及び BSA を添加し、4℃で保存  
 ↓  
 抗AFP-IgG-GOD 標識抗体

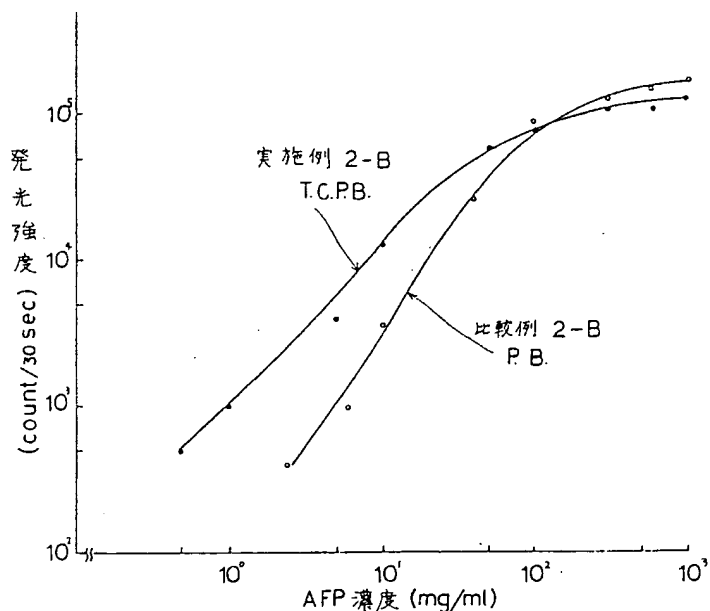
第 7 図

抗 AFP-IgG 液覆の固相 (T.C.P.B., P.B.)  
 ↓  
 ⇒ 100 倍希釈の抗AFP-IgG-GOD 標識抗体 (0.1 ml)  
 ↓  
 ⇒ C 液 (0.2 ml) を添加  
 ↓  
 室温で 1 晩静置  
 ↓  
 固相 (T.C.P.B., P.B.) を蒸留水で 3 回洗浄  
 ↓  
 新しい試験管に移し換える  
 ↓  
 ⇒ (0.5 mol/l グルコース · 0.01 mol/l (pH 5.1)  
 酢酸緩衝液) (0.3 ml) を添加  
 ↓  
 37℃で 2 時間静置  
 ↓  
 0.1 ml をサンプリング  
 ↓  
 ⇒  $2 \times 10^{-7}$  mol/l ルミノール、0.2 mol/l (pH 9.8)  
 炭酸緩衝液 (0.5 ml)、 $6 \times 10^{-3}$  mol/l フェリシア  
 ン化カリ水溶液 (0.5 ml) を添加  
 ↓  
 15 秒待ち、15~45 秒間の発光量を積算

第 8 図



第 9 図



第 10 図

